



**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE NEMÁTODES-DAS-
LESÕES-RADICULARES, *PRATYLENCHUS* SPP.
ASSOCIADOS À CULTURA DA BATATEIRA EM PORTUGAL**

Tânia dos Milagres Pato

Relatório de Estágio Profissionalizante para obtenção do Grau de
Mestre em Agro-Pecuária

Júri:

Presidente: Doutoramento, Isabel Rosa Maria L. B. V. Andrade, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Agrónómicas, Escola Superior Agrária de Coimbra

Arguente: Doutoramento, Isabel Luci Pisa Mata da Conceição, Professora Auxiliar do Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

Orientadora: Doutoramento, Maria José Moreno da Cunha, Professora Adjunta do Departamento de Ciências Agrónómicas, Escola Superior Agrária de Coimbra

Orientadora externa: Pós-Doutoramento, Ivânia Sofia Grasina Esteves, Bolseira de Investigação no Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

Coimbra, 2015

Agradecimentos

A realização deste relatório de estágio profissionalizante de mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de agradecer, em particular:

à Professora Doutora M^a José Cunha, pela disponibilidade em orientar este estudo, pela orientação científica, pela revisão crítica do texto, opiniões e sugestões;

à Doutora Ivânia Esteves, pela disponibilidade de orientar o trabalho prático e escrito, pela exigência do método e rigor, pela incansável orientação científica, pela revisão do texto, pela cedência e indicação de bibliografia relevante para o estudo, pela acessibilidade, paciência e simpatia demonstradas, pela confiança que me concedeu e pelo permanente estímulo para finalizar este estudo;

à Doutora Isabel Abrantes por me ter aceite no Laboratório de Nematologia e ter-me feito sentir em casa;

à equipa do Laboratório de Nematologia da Universidade de Coimbra por me terem recebido tão bem e por estarem sempre dispostos a ajudar;

aos meus amigos em geral e em particular à Tânia Carpinteiro, Miriam Santos e à Rita Agante pela sua amizade, disponibilidade e espírito de entreajuda;

ao meu noivo, Manuel Paulo pela paciência, ajuda e apoio incondicional;

à minha família pelo apoio e compreensão, pelos sacrifícios e pelo encorajamento;

e por fim, um especial agradecimento ao meu Pai, onde quer que esteja, está com certeza a olhar e a torcer por mim e pelo meu sucesso

A todos o meu muito Obrigada.

Resumo

Os nemátodes-das-lesões-radiculares (NLR), *Pratylenchus* spp., são parasitas, economicamente, importantes de várias culturas incluindo, por exemplo, a batata. No entanto, para que se possam desenvolver estratégias eficazes e sustentáveis para a gestão destes nemátodes é necessário obter mais informações sobre a sua diversidade e patogenicidade. O objetivo deste estudo foi a caracterização de duas espécies de NLR que ocorrem, frequentemente em campos de batata Portugueses, *P. neglectus* e *P. penetrans*.

Na primeira parte do trabalho, a identidade dos isolados de NLR foi confirmada através de técnica de PCR. Os resultados permitiram identificar três isolados de *P. neglectus* (A5, A9 e A38) e um de *P. penetrans* (A34). Na segunda parte do estudo, a capacidade de multiplicação *in vitro* dos quatro isolados foi avaliada em discos de cenoura inoculados com fêmeas grávidas de NLR. Após incubação a 25°C, durante 84 dias, foram encontradas diferenças significativas entre os fatores de reprodução de *P. neglectus* ($FR_{(A5)} = 88$; $FR_{(A9)} = 183$; $FR_{(A38)} = 194$) e *P. penetrans* ($FR_{(A34)} = 12$). Concluiu-se também que o tempo de incubação influenciou a taxa de reprodução e a densidade populacional dos NLR. Neste estudo avaliou-se ainda a reprodução dos isolados A5 e A9 de *P. neglectus* nas variedades comerciais de batata Agria e Monalisa, inoculadas com 2000 NLR/batateira. Após crescimento das plantas em vaso, durante 84 dias a 25°C, observou-se que ambos os isolados foram capazes de se reproduzir e completar o seu ciclo de vida nas duas variedades ($FR > 1$). Embora o isolado A9 tenha demonstrado ter maior capacidade reprodutiva, comparativamente a A5, as diferenças foram significativas apenas para a variedade Monalisa ($FR = 5,9$). A população final de NLR encontrada nas raízes foi superior à encontrada no solo nas variedades Agria e Monalisa parasitadas com o isolado A9. Foram ainda observadas lesões nas raízes e protuberâncias, em forma de verruga, nos tubérculos infetados com NLR. Tal como no ensaio de multiplicação em cenoura, os resultados obtidos neste estudo sugerem a existência de variabilidade intra-específica em *P. neglectus*, uma vez que os FR obtidos foram diferentes para os isolados estudados. O conhecimento dos impactos dos NLR na cultura da batata poderá, no futuro, ajudar ao desenvolvimento de estratégias de gestão mais sustentáveis para estes nemátodes.

Palavras-chave: Discos de cenoura, fator de reprodução, nematodes-das-lesões radiculares, *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Solanum tuberosum*

Abstract

Root-lesion nematodes (RLN), *Pratylenchus* spp., are economically important plant-parasitic nematodes of several crops, including potato. However, in order to define effective and sustainable integrated nematode pest management programs, more information about the diversity and pathogenicity of RLN is needed. The objective of this study was to characterize two RLN species, *P. neglectus* and *P. penetrans* that occur frequently in Portuguese potato fields. In the first part of the work, the identity of the RLN isolates was confirmed using PCR techniques. Three out of the four isolates included in this study were identified as *P. neglectus* (A5, A9 and A38) and one as *P. penetrans* (A34). In the second part of the work, the multiplication of the four RLN isolates was evaluated on carrot disc cultures, inoculated with gravid RLN females. After incubation at 25°C for 84 days, significant differences were found between the reproductive factors (RF) of *P. neglectus* ($RF_{(A5)} = 88$; $RF_{(A9)} = 183$ $RF_{(A38)} = 194$ e *P. penetrans* ($RF_{(A34)} = 12$). Results have also shown that the incubation time influenced the rate of RLN reproduction and population densities on carrot. Finally, in the last part of the work, the reproduction of *P. neglectus* isolates (A5 and A9) was assessed in the potato commercial cultivars “Agria” and “Monalisa” using an inoculation rate of 2000 RLN/potato plant. After growth in pots for 84 days at 25°C, both isolates were able to reproduce and to complete their life cycle on both potato cultivars ($RF > 1$). Although the reproductive factors were greater for isolate A9, differences were only significantly higher in cultivar Monalisa ($RF = 5,9$). For this isolate, the numbers of nematodes found on roots were significantly higher than the numbers found in soil, in both cultivars. Moreover, root lesions and wart-like protuberances in tubers were observed in RLN infected plants. The results found in this study suggested the existence of intraspecific variation in *P. neglectus*, since differences in RF were found between isolates of this species, both on carrot discs and potato plants. Information about the potential impacts of RLN on potato may contribute, in future, to develop sustainable strategies to manage these nematodes on potato crops.

Key words: carrot discs, reproduction factor, root-lesion nematodes, *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Solanum tuberosum*

Índice:

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras	vi
1.Introdução.....	1
2.Revisão bibliográfica.....	2
2.1 Cultura da batata: importância e principais problemas fitossanitários	2
2.2 Nemátodes fitoparasitas	3
2.3 Nemátodes fitoparasitas da batateira com importância económica.....	4
2.3.1 Nemátodes-de-quisto da batateira (NQB)	4
2.3.2 Nemátodes-das galhas-radiculares (NGR)	5
2.3.3 Nemátodes-das lesões-radiculares (NLR).....	6
2.3.3.1 Hospedeiros e sintomas na batateira.....	6
2.3.3.2 Ciclo de vida de <i>Pratylenchus</i> spp.	7
2.4 Medidas de controlo	8
3. Identificação molecular de NLR	9
3.1 Materiais e Métodos	10
3.1.1.Extracção de DNA.....	10
3.1.2. Reacção em Cadeia da Polimerase.....	10
3.2 Resultados	12
3.3 Discussão.....	14
4. Propagação, manutenção e multiplicação <i>in vitro</i> de isolados de NLR	15
4.1 Materiais e métodos.....	15
4.1.1Preparação dos discos de cenoura	15
4.1.2.Estudo comparativo de multiplicação <i>in vitro</i>	16
4.2 Resultados	18
4.2.1.Multiplicação <i>in vitro</i> dos isolados.....	18
4.2.2.Estudo comparativo de multiplicação <i>in vitro</i>	19
4.3 Discussão.....	22
5. Avaliação da patogenicidade de dois isolados de <i>Pratylenchus neglectus</i>	24
5.1.1 Materiais e métodos.....	25
5.1.2 Resultados	27

5.1.3 Discussão.....	28
6. Conclusões finais/Considerações finais	29
7. Bibliografia.....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1- Origem geográfica dos isolados de <i>Pratylenchus</i> spp. estudados	10
Tabela 2- Sequência de pares de primers específicos	11
Tabela 3- Condições de amplificação para cada primer.....	12
Tabela 4 - População final por disco de cenoura (Pf) e fator de reprodução (FR) de <i>Pratylenchus neglectus</i> (A5, A9, A38) e <i>P. penetrans</i> (A34) 56 dias após a inoculação (DAI) com 10 fêmeas grávidas (Pi)*.	19
Tabela 5- População final por disco de cenoura (Pf) e fator de reprodução (FR) de <i>Pratylenchus neglectus</i> (A5, A9, A38) e <i>P. penetrans</i> (A34) 84 dias após a inoculação (DAI) com 10 fêmeas grávidas (Pi).	20
Tabela 6- Reprodução de <i>Pratylenchus neglectus</i> (isolados A5 e A9) em <i>Solanum tuberosum</i> L. variedades. Agria e Monalisa, 84 dias após inoculação com 2000 nemátodes / planta a 25 °C*	27
Tabela 7- População final de <i>Pratylenchus neglectus</i> (isolados A5 e A9) no solo e em raízes de <i>Solanum tuberosum</i> L., 84 dias após inoculação com 2000 nemátodes/planta, a 25 °C*	28

Lista de Figuras

Figura 1- Ciclo de vida <i>Pratylenchus</i> spp.	7
Figura 2- Produtos de PCR de <i>Pratylenchus</i> spp. após amplificação com os primers D2/D3 (marcador molecular de 2000 pares de bases)	13
Figura 3 - Produtos de PCR de <i>Pratylenchus penetrans</i> após amplificação com os primers PPEN/D3B (marcador molecular de 1000 pares de bases).....	13
Figura 4- Produtos de PCR de <i>Pratylenchus neglectus</i> após amplificação com os primers PNEG-F1/D3B5 (marcador molecular de 2000 pares de bases).....	13
Figura 5 - Preparação dos discos de cenoura para inoculação de <i>Pratylenchus</i> spp	16
Figura 6- Fêmea grávida de <i>Pratylenchus</i> spp	17
Figura 7- Placa de Doncaster usada para contagem de nemátodes	18
Figura 8- Cenoura infetada com <i>Pratylenchus</i> spp.	18
Figura 9- Proporção de adultos, jovens e ovos nos isolados <i>Pratylenchus neglectus</i> , A aos 56 DAI e B aos 84 DAI	21
Figura 10- Proporção de adultos, jovens e ovos no isolado de <i>Pratylenchus penetrans</i>	22
Figura 11- Ensaios em vasos com cultivares de batata	26
Figura 12- Métodos de extração de nemátodes em raízes (método do funil) e no solo (método do tabuleiro)	26

1.Introdução

Os nemátodes são um grupo de animais vermiformes que se encontram em vários habitats, como parasitas e, também, como organismos livres. Os nemátodes que parasitam plantas (fitoparasitas) são geralmente microscópicos e podem causar estragos em culturas com interesse agronómico (Coyne *et al.*, 2007), como por exemplo, na batateira, *Solanum tuberosum*. Os nemátodes-de-quisto da batateira (NQB), *Globodera* spp., são um problema frequente em Portugal Continental, encontrando-se presentes nas principais regiões produtoras de batata (Cunha *et al.*, 2004). Além dos NQB, outros nemátodes, como por exemplo, os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., têm sido encontrados em campos de batata nacionais, coexistindo com os NQB (Conceição *et al.*, 2009). Embora haja algum conhecimento sobre a diversidade e patogenicidade dos NQB e NGR em Portugal, pouco se sabe sobre o impacto de outros nemátodes patogénicos como os nemátodes-das-lesões-radiculares (NLR), *Pratylenchus* spp. Em Portugal, os NLR têm sido encontrados em várias culturas, no entanto é necessária mais informação sobre a sua diversidade e patogenicidade na cultura da batata. Devido às alterações climáticas globais, ocorridas nas últimas décadas, é possível que os NLR possam prevalecer sobre os NQB, agravando as perdas de produtividade desta cultura. Os NLR de uma forma geral, apresentam uma vasta gama de plantas hospedeiras limitando o uso de rotação de culturas e potenciando o risco de um aumento da densidade populacional destes nemátodes.

Deste modo, é fundamental conhecer as espécies de NLR que parasitam a batateira em Portugal, para que se possam desenvolver estratégias de controlo sustentáveis para a gestão integrada destes nemátodes, uma vez que as plantas infetadas tornam-se mais suscetíveis ao ataque de outros organismos patogénicos.

O presente estudo teve como objetivo a caracterização de duas espécies de NLR que ocorrem frequentemente em campos de batata portugueses, *Pratylenchus neglectus* e *P. penetrans*, (Esteves *et al.*, 2015). Ambas as espécies são extremamente polífagas e podem causar estragos, economicamente importantes, em plantas anuais e perenes. Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Confirmar a identidade de *P. neglectus* e *P. penetrans* através de técnicas moleculares (capítulo 3);

- b) Comparar a capacidade de multiplicação *in vitro* de três isolados de *P. neglectus* e um isolado de *P. penetrans* (capítulo 4);
- c) Avaliar a suscetibilidade de duas variedades comerciais de batata, “Agria” e “Monalisa”, a dois isolados de *P. neglectus* (capítulo 5);

A primeira parte do trabalho teve como objetivo confirmar a identificação morfológica de quatro isolados de NLR realizada anteriormente no Laboratório de Nematologia do Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra. Seguidamente, pretendeu-se comparar a da capacidade de multiplicação *in vitro* desses isolados em discos de cenoura (capítulo 4). Nesta parte do trabalho pretendeu-se também obter inóculo suficiente para os ensaios seguintes (capítulo 5). A última parte do trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de duas variedades comerciais de batata, “Agria” e “Monalisa” a dois isolados de *P. neglectus*, através da realização de ensaios de vaso. Este estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto ‘BIONEM - Gestão bio-sustentável de espécies emergentes de nemátodes fitoparasitas da batateira – novas ameaças na Europa’, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, FCT (PTDC/AGR-PRO/2510/2012).

2.Revisão bibliográfica

2.1 Cultura da batata: importância e principais problemas fitossanitários

A batateira, *Solanum tuberosum*, é uma planta da família das Solanáceas de elevado interesse agronómico que produz tubérculos comestíveis, ricos em amido. Estas estruturas são caules subterrâneos que funcionam como órgãos de reserva da planta e através dos quais se reproduz vegetativamente (Ducreux *et al.*,1986). Devido ao seu elevado valor nutricional, a batata é atualmente um dos alimentos mais consumidos em todo o mundo. Os principais países produtores desta cultura, a nível mundial, são a China, a Rússia e a Índia, atingindo uma produção de cerca de 300 milhões de toneladas/ano (COTHN, 2008; FAOSTAT, 2013). Em Portugal o consumo de batata tem um papel significativo na alimentação, com consumos anuais médios *per capita* superiores aos do consumo de cereais (Belchior, 2000). A cultura da batata é muito importante, quer do ponto de vista agronómico e económico, quer do ponto de vista social, sendo produzida por todo o país não só para venda, mas também para autoconsumo. As principais zonas de produção no território nacional encontram-se nas

regiões da Beira Interior, Beira Litoral, Entre Douro e Minho, Ribatejo e Oeste e Trás-os-Montes (COTHN, 2008). As variedades Desirée, Kennebec, Jaerla, Spunta, Monalisa, Marine, Astérix e Stemser são algumas das mais utilizadas (OMAIAA, 2014). De acordo com o Instituto Nacional de Estatística (2013) a cultura ocupa uma área média de 26 000 hectares, com produções que rondam, em média, 17 toneladas/hectare dependendo das condições climáticas e ocorrência de pragas e doenças registadas em cada ano. Tal como acontece em outras culturas, a batateira é suscetível ao ataque de doenças e pragas que podem reduzir a qualidade e/ou a quantidade da produção. As doenças mais comuns que atacam a batateira são: a alternariose (*Alternaria solani*), antracnose (*Colletotrichum coccodes*), míldio (*Phytophthora infestans*), podridão anelar (*Clavibacter michiganensis*), podridão húmida dos tubérculos (*Erwinia carotovora*), mal murcho (*Ralstonia solanacearum*) e doenças causadas por vírus (vírus do enrolamento, vírus Y e vírus X). De entre as pragas mais frequentes, destacam-se os ataques de afídeos (*Macrosiphum euphorbiae*), alfinetes (*Agriotes* spp), escaravelhos (*Leptinotarsa decemlineata*), larvas mineiras (*Liriomyza huidobrensis*), coleópteros crisomelídeos (*Epitrix similares*) e nemátodes fitoparasitas (géneros *Globodera*, *Meloidogyne*, *Ditylenchus* e *Pratylenchus*) (Lopes & Simões, 2006).

2.2 Nemátodes fitoparasitas

Os nemátodes são organismos invertebrados, não segmentados, com simetria bilateral, que proliferam nos mais diversos habitats, colonizando quase todos os biótopos. Formam um Filo bem definido que compreende mais de 20 000 espécies descritas, constituindo o grupo de metazoários mais abundante no solo. A maioria tem dimensões reduzidas (1 a 2 mm) e formato fusiforme, apresentando uma grande variedade trófica (Nickle, 1991; Bernard, 1992). Os nemátodes que parasitam plantas designam-se por fitoparasitas ou fitófagos, são geralmente microscópicos e constituem um problema grave para a agricultura (Coyne *et al.*, 2007). A principal característica morfológica dos nemátodes fitoparasitas é a presença de um estilete bucal típico (Castillo & Vovlas, 2007). As plantas infetadas apresentam-se geralmente cloróticas, atrofiadas, e/ou murchas, especialmente durante os períodos de maior stress e temperaturas altas, sintomas que também podem ser atribuídos a outras doenças das raízes ou a fatores ambientais. A densidade populacional de nemátodes, a virulência da espécie ou isolado e a resistência da planta hospedeira são alguns dos fatores que influenciam a severidade dos estragos causados por nemátodes nas plantas, assim como o clima, a disponibilidade de água, fertilidade do solo e a presença de outros organismos patogénicos

(Coyne *et al.*, 2007). Os nemátodes fitoparasitas pertencentes aos géneros *Globodera* (nemátodes-de-quisto), *Meloidogyne* (nemátodes-das-galhas-radiculares) e *Pratylenchus* (nemátodes-das-lesões-radiculares) assumem particular relevância económica uma vez que são responsáveis por estragos avultados em várias culturas agrícolas, não só em Portugal como em quase todo o mundo (Jones *et al.*, 2013).

2.3 Nemátodes fitoparasitas da batateira com importância económica

2.3.1 Nemátodes-de-quisto da batateira (NQB)

Os NQB, *Globodera pallida* e *G. rostochiensis*, constituem um grave problema nas áreas de produção de batata, estimando-se que 9% da produção mundial seja perdida, anualmente, devido a estes nemátodes (Jones *et al.*, 2013). Ambas as espécies são endoparasitas sedentários das raízes, caracterizados por acentuado dimorfismo sexual. Os jovens de segundo estágio (J2) – estágio vermiforme ‘infetivo’- movem-se no solo até encontrarem raízes de plantas hospedeiras. Com o auxílio do estilete penetram na raiz, junto ao ápice, e migram intracelularmente até se imobilizarem. Sofrem várias mudas até atingirem o estágio adulto. Os machos adultos mantêm a configuração vermiforme e têm vida livre e curta no solo. As fêmeas adultas são piriformes, depois esféricas e permanecem fixas nas raízes. Após a fecundação, aumentam de tamanho, devido ao desenvolvimento dos ovos, e rompem a epiderme da raiz ficando com a parte anterior do corpo no interior da raiz e a parte posterior do corpo no exterior. A designação de quisto deve-se ao fato da fêmea, depois de morta, se transformar num invólucro de forma esférica e fortemente pigmentado. Este quisto contém centenas de ovos e desempenha uma função essencial na sobrevivência destes nemátodes, pois protege eficazmente os ovos, permitindo-lhes sobreviver por muitos anos no solo mesmo sem substrato vegetal (Henriques, 2012). A batateira é o principal hospedeiro dos NQB, mas também podem parasitar outras solanáceas como o tomateiro, a beringela, entre outras. No campo, a presença dos NQB traduz-se pela observação de manchas no terreno, mais ou menos circulares, correspondendo a zonas em que as plantas têm crescimento diminuto, estão amarelas e murchas. No entanto, tal como acontece com outros nemátodes fitoparasitas, os prejuízos causados por NQB são muitas vezes atribuídos a outras causas como, por exemplo, a outros organismos patogénicos, fertilizações inadequadas, escassez de humidade do solo, entre outras, devido à pouca especificidade dos sintomas (Henriques, 2012). A disseminação destes nemátodes a grandes distâncias é assegurada, principalmente, através da terra infestada aderente aos tubérculos, aos bolbos, às raízes das plantas e à maquinaria agrícola. Os NBQ

são um problema frequente em Portugal Continental, encontrando-se presentes nas principais regiões produtoras de batata (Santos *et al.*, 1995; Cunha *et al.*, 2004). Estudos previamente realizados pela ESAC e Universidade de Coimbra demonstraram que os NQB estão presentes em todas as regiões de produção de batata, tendo sido detetados, em média, em 50% dos campos e nalgumas áreas, em 100% dos campos (Cunha *et al.*, 2004).

2.3.2 Nemátodes-das galhas-radiculares (NGR)

Os NGR, *Meloidogyne* spp., estão entre os nemátodes, economicamente, mais importantes na agricultura e podem afetar várias culturas incluindo, por exemplo, a batata. O sinal mais característico, revelador da presença destes nemátodes, é a presença de galhas radiculares (Mai & Abawi, 1987). Estas galhas podem variar no seu tamanho, dependendo da espécie de nemátode envolvida e da localização da galha no sistema radical. As raízes que apresentam galhas tornam-se mal formadas, desenvolvendo raízes pequenas e grossas, apresentando um denso e espesso sistema radical. O crescimento e ramificação da raiz são frequentemente suprimidos (diminuindo o volume e superfície radical) inibindo-se a síntese de citoquininas, giberlinas e outros metabolitos essenciais ao crescimento da planta. A formação destas galhas resulta da reação da planta à entrada e permanência do nemátode no cilindro vascular da raiz, sobretudo devido a secreções libertadas pela fêmea que induzem fenómenos de hiperplasia e hipertrofia nos tecidos (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O transporte de água e nutrientes é afetado, assim como a taxa fotossintética, pondo em causa o funcionamento de processos bioquímicos essenciais à sobrevivência da planta (Mai & Abawi, 1987). Tal como os NQB, os NGR são endoparasitas sedentários radiculares caracterizados por apresentarem dimorfismo sexual entre machos e fêmeas. Os jovens de segundo estágio eclodem de ovos que foram depositados pelas fêmeas e que se encontram agregados em massas gelatinosas expostas à superfície das raízes. Muitas espécies de *Meloidogyne* são partenogenéticas ou partenogenéticas facultativas. Isso significa que os machos não são necessários para se completar o ciclo de vida e ovos viáveis podem ser produzidos pelas fêmeas sem que ocorra fecundação. Por essa razão os machos podem ser raros em algumas espécies e serem apenas encontrados quando a população de NGR estiver sujeita a algum tipo de stress ambiental. Embora em Portugal os NGR não sejam reconhecidos como pragas graves da batata, várias espécies têm sido encontradas nesta cultura e identificadas, incluindo *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. hispanica*, *M. incognita*, e *M. javanica* (Conceição *et al.*, 2009).

2.3.3 Nemátodes-das-lesões-radiculares (NLR)

Os NLR pertencem ao género *Pratylenchus*, são parasitas migratórios e entram na raiz hospedeira para se alimentarem e se reproduzirem. Estes nemátodes movimentam-se livremente no solo e, dentro do tecido radicular, migram de uma raiz para outra, podendo colocar os seus ovos no solo ou na raiz da planta. O seu aparelho bucal é constituído por um estilete bucal típico, que permite que se alimentem do tecido radicular, principalmente do córtex, da planta infetada (Castillo & Vovlas, 2007). Os NLR apresentam uma vasta gama de hospedeiros o que limita o uso de rotação de culturas, potenciando o risco de um aumento da densidade populacional destes nemátodes. Além disso, as raízes infetadas por NLR podem potenciar a infeção por outros organismos patogénicos como é o caso do fungo *Verticillium dahliae*, agente causal da verticiliose da batata. A interação sinérgica entre *P. penetrans* e *V. dahliae* aumenta o grau de severidade desta doença (Rowe *et al.*, 1985). Estudos conduzidos por Holgado *et al.* (2009), relataram igualmente uma interação sinérgica entre *P. penetrans* e a bactéria *Streptomyces scabies*, agente causal da sarna comum da batateira.

2.3.3.1 Hospedeiros e sintomas na batateira

A maioria das culturas herbáceas e vegetais podem ser atacadas por uma ou mais espécies de NLR. Culturas como a cenoura, milho, banana, forrageiras e leguminosas, amendoim, batata, tabaco, tomate e trigo são frequentemente afetadas. As árvores de fruto também são hospedeiras de NLR, entre elas a macieira, a pereira, o marmeleiro, sendo as espécies *P. penetrans* e *P. vulnus* as, economicamente, mais importantes. Os pomares de citrinos podem ser atacados por *P. brachyurus* e *P. coffeae* (Castillo & Vovlas, 2007). Em Portugal, os NLR têm sido encontrados em várias culturas, incluindo na batata (Abrantes *et al.*, 1987; Esteves *et al.*, 2015). As espécies *P. crenatus*, *P. neglectus* e *P. thornei* foram identificadas a partir de raízes de batata amostradas em campos localizados nas regiões produtoras no Norte (Porto), Centro (Aveiro, Castelo Branco, Coimbra, Guarda e Leiria) e Sul (Lisboa, Setúbal e Faro) de Portugal. Em alguns campos detetou-se ainda a coexistência de NLR com NQB e NGR (Esteves *et al.*, 2015).

As plantas infetadas com NLR podem apresentar crescimento reduzido e amarelecimento da folhagem. As raízes e os tubérculos de batateira podem apresentar necroses graves. As lesões nos tubérculos não são profundas e raramente penetram a camada mais interior. Estas lesões

variam consoante a espécie de NLR em causa, sendo que no caso de *P. penetrans* podem ser observadas protuberâncias em forma de verruga (Castillo & Vovlas, 2007).

2.3.3.2 Ciclo de vida de *Pratylenchus* spp.

O ciclo de vida dos NLR divide-se em seis estádios distintos: estágio embrionário ou ovo, quatro estádios larvares juvenis e um estágio adulto (figura 1). A fêmea deposita os seus ovos, individualmente, (postura isolada sem formação de massas de ovos) na raiz da planta hospedeira ou no solo. Após o desenvolvimento embrionário, o primeiro estágio juvenil (J1) sofre uma muda e eclode, dando origem ao segundo estágio (J2). Todos os estádios juvenis e adultos são vermiformes e móveis, à exceção do J1, e todos os estádios a partir do J2 têm a capacidade de penetrar a raiz, alimentar-se e formar lesões necróticas acastanhadas que vão aumentando gradualmente, deixando entradas para fungos e bactérias. Na raiz, os NLR penetram a epiderme, preferencialmente junto à zona da coifa, migrando intracelularmente até ao córtex, alimentando-se de células do tecido vegetal, provocando a formação de cavidades. Após a lise celular, os nemátodes migram até encontrarem novas células de tecido vegetal saudável. A presença de machos é frequente em algumas espécies e rara noutras, podendo a reprodução ser sexuada (anfimítica) ou assexuada (partenogénica). Durante o seu ciclo de vida, os diferentes estádios de NLR, a partir do J2, podem sair para o solo e voltar para a raiz ou permanecer no interior da raiz. O ciclo demora, em média, 3 a 8 semanas, podendo ser influenciado por condições ambientais tais como temperatura, humidade, espécie da planta hospedeira e espécie de *Pratylenchus* (Castillo & Vovlas, 2007).

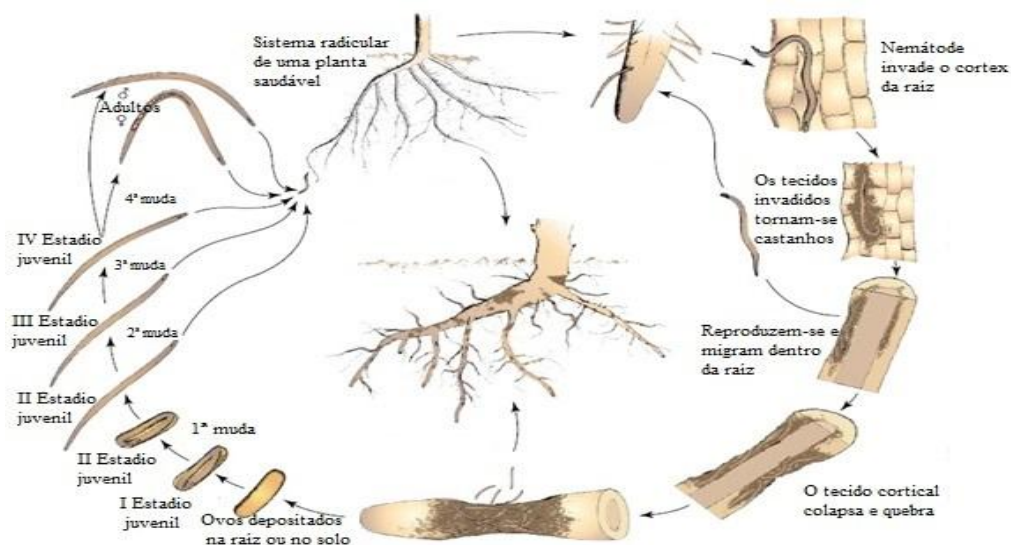


Figura 1- Ciclo de vida *Pratylenchus* spp.

Adaptado de Agrios, 2005.

2.4 Medidas de controlo

O controlo de nemátodes fitoparasitas é bastante difícil, uma vez que estes organismos vivem na planta mas também se encontram no solo e, quando as condições de temperatura e humidade são favoráveis, multiplicam-se rapidamente. No entanto, existem algumas medidas que devem ser tidas em conta que vão desde a escolha da semente e do local de sementeira até à colheita (Pinheiro *et al.*, 2009). Estas medidas podem ser divididas em medidas preventivas, culturais, físicas, biológicas ou químicas. Na prevenção é necessário evitar a entrada do fitoparasita na área de cultivo ou mantê-lo em níveis muito baixos, uma vez que a erradicação de nemátodes é praticamente impossível (Pinheiro *et al.*, 2009). O uso de batata de semente certificada, livre de nemátodes, é essencial para manter este grupo de organismos fora da área de cultivo. De entre as medidas culturais e físicas, possíveis, destacam-se a rotação de culturas, alqueive, solarização e o uso de plantas antagonistas, armadilha ou com ação nematodocida. A utilização de rotação de culturas permite reduzir as populações de nemátodes fitoparasitas, uma vez que ao utilizar culturas não hospedeiras estes acabam por morrer por falta de alimento. Outra medida é a utilização de alqueive que consiste em através de mobilizações de terreno periódicas e da aplicação de herbicidas, manter o terreno sem a presença de culturas e infestantes. A eficiência desta medida depende da sua duração, temperatura e teor de humidade do solo, sendo por isso recomendável deixar alguma humidade no solo para que os ovos possam eclodir e os juvenis se movimentem. Com a mobilização do terreno os nemátodes consumirão mais reservas energéticas, dificultando a sua sobrevivência. Esta prática tem como desvantagens o custo elevado para manter o solo limpo durante um período de tempo considerável, reduzindo os lucros do produtor e o favorecimento da erosão em períodos de chuva intensa (Pinheiro *et al.*, 2009). O uso de plantas armadilha é considerado como um bom método de controlo dos NQB, uma vez que existem plantas (p.e *Solanum sisymbriifolium*) que podem atrair e permitir a invasão de nemátodes, mas não permitem que estes se desenvolvam até à fase adulta (Timmermans *et al.*, 2007). A luta biológica contra nemátodes fitoparasitas pode resultar da ação de qualquer tipo de organismos antagonistas como bactérias (Sayre & Walter, 1981), ou fungos nematófagos (Kerry, 1990). Por último o controlo químico é uma medida que, embora seja eficiente, tem várias desvantagens entre elas, o custo económico e o impacto ambiental e para a saúde humana não devendo, por isso, ser visto como a única nem a forma mais eficaz de redução dos níveis populacionais de nemátodes fitoparasitas (Hague & Gowen, 1987).

3. Identificação molecular de NLR

O género *Pratylenchus* contém mais de 60 espécies descritas (Loof, 1961), que podem ser identificadas através de diferenças morfobiométricas e morfológicas ou através de técnicas bioquímicas e moleculares. Os NLR são reconhecíveis pela sua região labial fortemente esclerotizada, sobreposição das glândulas esofágicas e conteúdo intestinal escuro. As fêmeas possuem um ovário anterior e um saco pós-uterino de comprimento variável (Tihohod, 1993). No entanto, a identificação morfológica é complexa porque alguns dos caracteres morfológicos utilizados, além de serem difíceis de observar, apresentam uma grande variabilidade intra-específica (Castillo & Vovlas, 2007). A precisão da identificação aumenta quando aos caracteres morfobiométricos se adicionam outros, sobretudo de natureza bioquímica e molecular. Os caracteres bioquímicos e moleculares, que têm sido utilizados na diferenciação das espécies deste género, ainda não são conhecidos para todas as espécies. Desde modo, a identificação morfológica deve ser complementada com a identificação molecular (Uehara *et al.*, 1998; Waeyenberge *et al.*, 2000; Al-Banna *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2008). Os fragmentos de expansão D2 D3 da região 28 S do ácido desoxirribonucleico ribossomal (rDNA) são usados, frequentemente, para identificação e caracterização molecular de NLR (De la Peña *et al.*, 2007; Subbotin *et al.*, 2008), sendo a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) amplamente usada (Uehara *et al.*, 1998; Waeyenberge *et al.*, 2000; Al-Banna *et al.*, 2004). A técnica de PCR é um método que permite a criação de múltiplas cópias de DNA, a partir de amostras com quantidades de DNA reduzidas. A amplificação permite que os fragmentos de DNA possam ser visualizados em géis de agarose ou poliacrilamida, através da técnica de eletroforese. A posição dos fragmentos no gel, com relação a um padrão com peso molecular conhecido (marcador molecular), permite avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Esta parte do trabalho teve como objetivo verificar a identidade dos quatro isolados de NLR (A5, A9, A34 e A38) usados neste estudo. A identificação feita neste estudo foi molecular, uma vez que a identificação morfológica foi realizada em estudos anteriores. Os isolados foram extraídos de raízes de batateiras amostradas em campos Portugueses (tabela 1) e reproduzidos em discos de cenoura a partir da inoculação de uma fêmea grávida.

Tabela 1- Origem geográfica dos isolados de *Pratylenchus* spp. estudados

Isolado	Origem
A5	Coimbra
A9	Leiria
A34	Aveiro
A38	Aveiro

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1.Extracção de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de 1-20 nemátodes, através do método de centrifugação em micro colunas, com o kit comercial “DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)”. O material foi digerido usando a enzima proteínase K e o tampão de lise respetivo. Após incubação a 56°C, 600 rpm, durante 3-6 h, as condições de tamponização foram ajustadas e o produto foi transferido para microcolunas com membrana de sílica. Esta membrana adsorve o DNA e possibilita a remoção da água presente na solução. Após várias centrifugações e lavagens sucessivas, com tampões adequados, que eliminam os contaminantes e inibidores enzimáticos, o DNA retido na membrana foi, finalmente, eluído em 100 µl de tampão de eluição e guardado a -20 °C, até ser amplificado.

3.1.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Cinco microlitros de extrato de DNA, obtido em 3.1.1, foi usado para amplificação do DNA, através da técnica PCR. A identificação molecular foi feita através do uso de pares de primers para amplificação da região 28S do DNA ribossómico (rDNA) (D2A/D3B) (De Lei *et al.*, 1999) e primers específicos para as seguintes espécies: *P. neglectus* (PNEG-F1/D3B5) (Yan *et al.*, 2008) e *P. penetrans* (PPEN/D3B) (Al-Banna *et al.*, 2004) (tabela 2). As condições de amplificação, para cada par de primers, encontram-se descritas na tabela 3.

As amostras para a PCR, com volume total de 25µl, continham 5 µl DNA, 0,75 U BioTaq DNA polymerase (Bioline, Germany), 1 x tampão + 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de desoxirribonucleotidos trifosfatos (dNTPs) e 0,5 µM de cada primer. O aparelho utilizado foi o GeneAmp PCR system 2700 thermocycler (Applied Biosystems).

Os produtos do PCR foram separados através de eletroforese (1h, 100 mV), em géis com 1% agarose, em tampão Tris Borato EDTA TBE (1x), corado com GreenSafe (Nzytech, Portugal). O tamanho das bandas foi estimado usando um marcador de DNA molecular de 1000 ou 2000 pares de bases (pb) (Bioline, Germany). As bandas foram visualizadas através de luz ultravioleta (UV).

Tabela 2- Sequência de pares de primers específicos

Primers	Espécie	Fragmento (bp)	Sequência do primer (5'-3')	Referência
D2A D3B	<i>Pratylenchus spp.</i>	750-1100	ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG TCGGAAGGAACCAGCTACTA	De Leij <i>et al.</i> , 1999
PNEG-F1 D3B5	<i>P. neglectus</i>	144	CGCAATGAAAGTGAACAATGTC AGTTCACCATCTTTTCGGGTC	Yan <i>et al.</i> , 2008
PPEN D3B	<i>P. penetrans</i>	278	TAAAGAATCCGCAAGGATAC TCGGAAGGAACCAGCTACTA	Al-Banna <i>et al.</i> , 2004

Tabela 3- Condições de amplificação para cada primer

Primer	Condições de amplificação
D2A/D3B	95°C 5 min
	94°C 30 seg
	55°C 45 seg
	72°C 1 min
	72°C 7 min
PPEN/D3B	95°C 3 min
	95°C 1 min
	62°C 1 min
	72°C 1 min
	72°C 7 min
PNEG-F1/D3B5	95°C 3 min
	95°C 30 seg
	60°C 30 seg
	72°C 30 seg
	72°C 7 min

3.2 Resultados

A identidade dos isolados A5, A9, A34 e A38 foi confirmada molecularmente através da utilização de primers que amplificam o género *Pratylenchus* (figura 2) e de primers específicos para as espécies *P. neglectus* e *P. penetrans* (figuras 3 e 4).

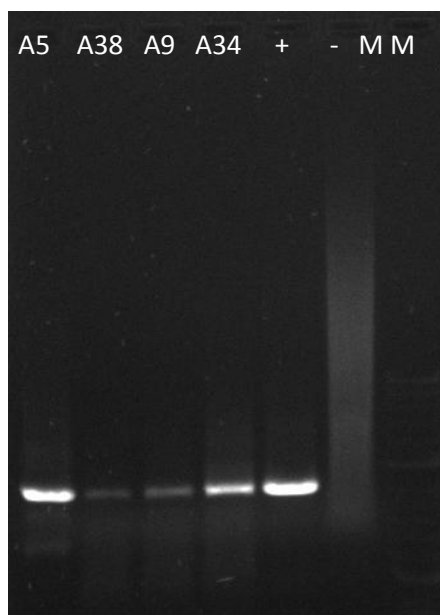


Figura 2- Produtos de PCR de *Pratylenchus* spp. após amplificação com os primers D2/D3 (marcador molecular de 2000 pares de bases)

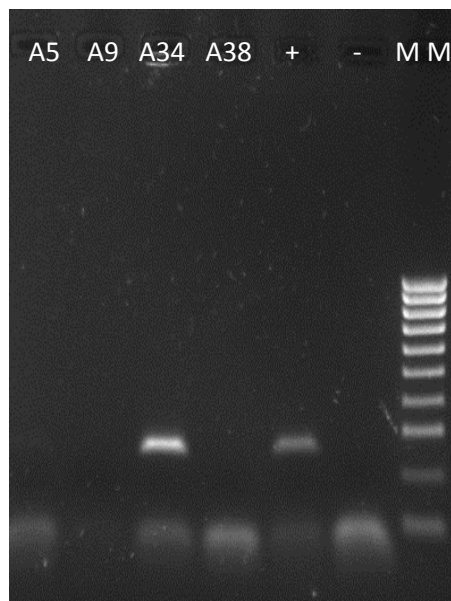


Figura 3 - Produtos de PCR de *Pratylenchus penetrans* após amplificação com os primers PPEN/D3B (marcador molecular de 1000 pares de bases)

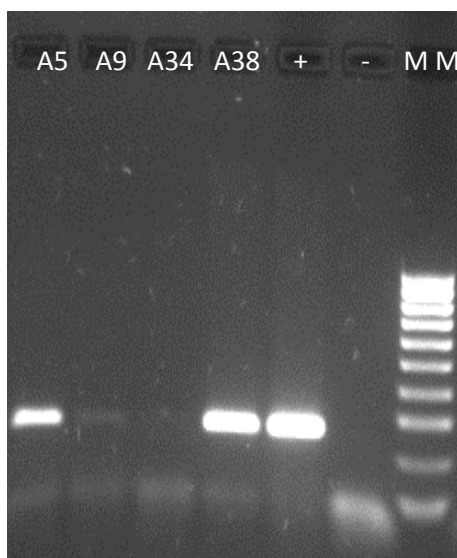


Figura 4- Produtos de PCR de *Pratylenchus neglectus* após amplificação com os primers PNEG- F1/D3B5 (marcador molecular de 2000 pares de bases)

Embora se tenham detetado diferenças na intensidade das bandas obtidas, um produto de cerca de 750 pb foi amplificado em todos os isolados com o par de primers D2A/D3B, confirmando a identidade de nemátodes pertencentes ao género *Pratylenchus* (figura 2). O par de primers de *P. neglectus*, PNEG-F1/D3B5, amplificou um único produto de PCR de ca. 140

pb nos isolados A5, A9 e A38, isolados que foram negativos quando testados com outros pares de primers específicos (figura 4). Um produto de PCR de ca. 280 pb foi amplificado no isolado A34, com o par de primers PPEN/D3B (figura 3), caraterístico de *P.penetrans*.

3.3 Discussão

Os isolados de NLR incluídos neste estudo foram identificados como sendo das espécies *P. neglectus* e *P. penetrans*. Ambas as espécies são importantes devido à sua ampla distribuição geográfica e patogenicidade em várias culturas hospedeiras, nomeadamente na batata. Nesta cultura, outras espécies de NLR, como por exemplo *P. alleni*, *P. crenatus*, *P. scribneri* e *P. thornei*, têm sido identificadas na Europa (Castillo & Vovlas, 2007). Para além destas outras espécies, como *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. vulnus* e *P. flakkensis*, são responsáveis por danos em batata em regiões tropicais (Jatala & Bridge, 1990). Dada a grande diversidade de NLR que parasitam a batata, a correta identificação é fundamental, para que seja possível avaliar a importância de cada espécie na cultura e para a implementação de programas de gestão integrada destes nemátodes, a fim de evitar a disseminação de NLR nas áreas de produção de batata. Neste estudo foram, por vezes, detetadas diferenças na intensidade das bandas de DNA observadas no gel após a eletroforese (figura 2). Este resultado poderá ser explicado devido a variações no número de nemátodes que foi utilizado para extração do DNA (1 a 20 nemátodes), o que terá originado variações na quantidade de DNA extraída. Para determinar variações intra-específicas entre isolados seriam necessários estudos de sequenciação. As técnicas de PCR que foram usadas neste trabalho não permitem detetar diferenças moleculares entre isolados da mesma espécie.

A identificação dos NLR foi feita individualmente para cada espécie de NLR, no entanto, o desenvolvimento de procedimentos rápidos e baratos que permitam a deteção simultânea e/ou identificação de diferentes espécies de NLR, pode ser útil para inspeções de quarentena e análises de rotina. As técnicas de PCR multiplex poderão proporcionar uma maneira fiável para a deteção de NLR dado que, com esta técnica, duas ou mais sequências podem ser amplificadas na mesma reação (Elnifro *et al.*, 2000). O estado sanitário da batata de semente é outro aspeto importante na produção de batata. Assim, o desenvolvimento de métodos diretos, para extração de DNA a partir do tubérculo, pode ser útil em testes de diagnóstico de rotina, para avaliação da qualidade do material utilizado para a instalação das culturas.

4. Propagação, manutenção e multiplicação *in vitro* de isolados de NLR

A multiplicação de nemátodes utilizando a técnica dos discos de cenoura foi, inicialmente, desenvolvida por O'Bannon & Taylor (1968) e tem vindo a ser amplamente utilizada para multiplicação *in vitro* de diferentes espécies de NLR, devido à sua simplicidade e baixo custo (Gonzaga *et al.*, 2010). Esta técnica permite obter condições padronizadas para a produção de inóculo de nemátodes, possibilitando a comparação de taxas de multiplicação entre diferentes populações. Além dos NLR, outros nemátodes, como por exemplo, *Radopholus similis*, podem ser multiplicados utilizando a técnica dos discos de cenoura (O'Bannon & Taylor, 1968).

O objetivo deste estudo foi avaliar a multiplicação de diferentes isolados de *Pratylenchus* e produzir inóculo para os testes de reprodução em vaso (capítulo 5)

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Preparação dos discos de cenoura

Na multiplicação *in vitro* foram utilizados três isolados de *P. neglectus* (A5, A9 e A38) e um de *P. penetrans* (A34). Os isolados foram multiplicados em discos de cenoura desinfetados, de acordo com método descrito por Castillo *et al.* (1995), com modificações. Foram utilizadas cenouras frescas que após lavagem com água da torneira corrente foram transferidas para dentro de uma câmara de fluxo laminar vertical de modo a prevenir possíveis contaminações (figura 5). Dentro da câmara, as cenouras foram passadas por água da torneira esterilizada, desinfetadas com álcool 70% (v/v) e passadas à chama durante alguns segundos. Seguidamente, com o auxílio de um bisturi estéril, retirou-se a epiderme, flamejando a lâmina a cada corte, e cortaram-se discos de cenoura com espessura aproximada de 6 mm. Após 3-4 h de exposição à luz ultra-violeta (UV), dentro caixas de Petri (Ø 90 mm) estéreis, os discos foram transferidos, individualmente, para caixas mais pequenas (Ø 50 mm), as caixas seladas com parafilme e guardadas à temperatura ambiente, até à inoculação com os NLR.

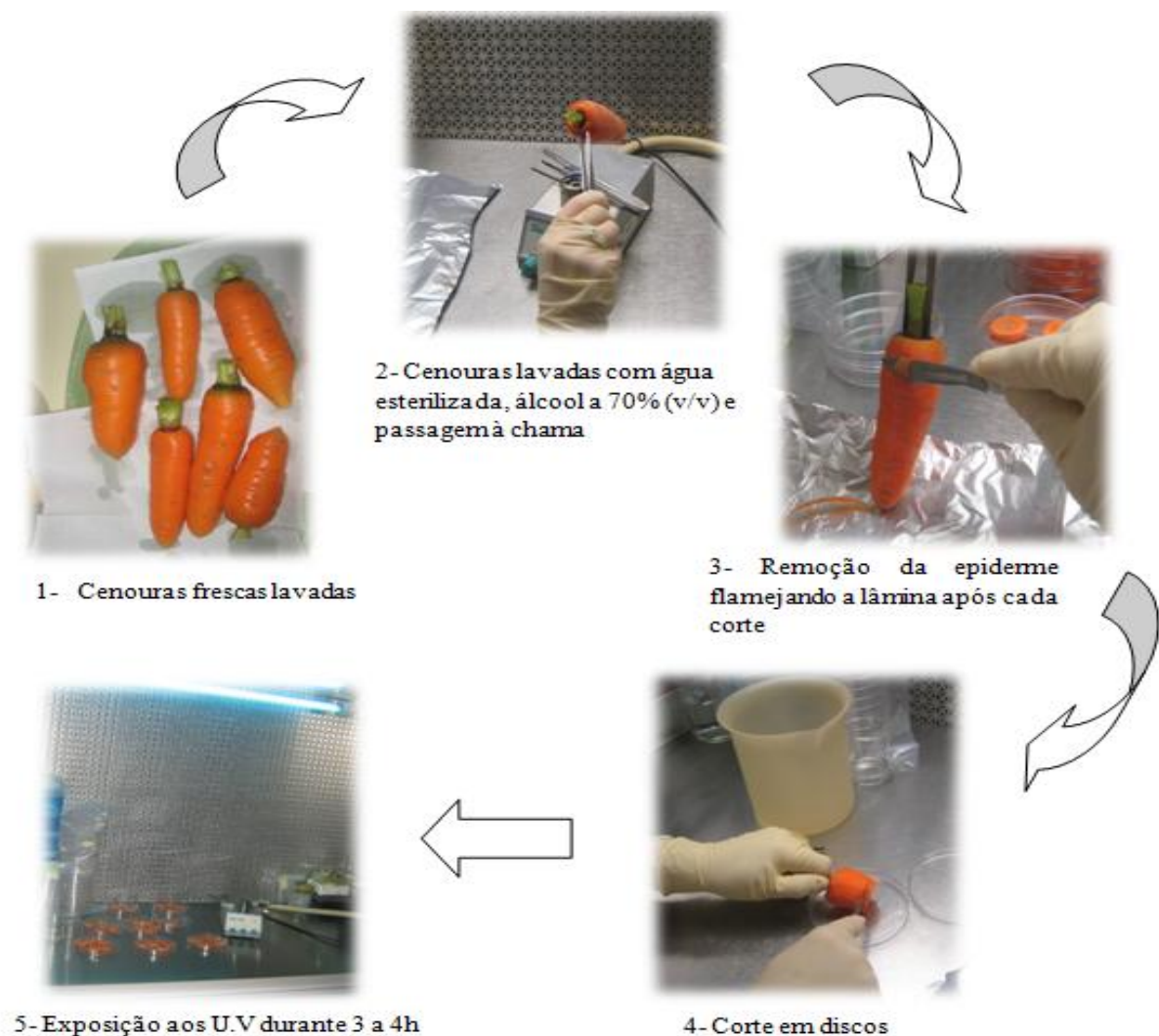


Figura 5 - Preparação dos discos de cenoura para inoculação de *Pratylenchus* spp

4.1.2. Estudo comparativo de multiplicação *in vitro*

No estudo comparativo de multiplicação *in vitro* seguiu-se o método descrito por Castillo *et al.* (1998). Para cada isolado, 10 fêmeas grávidas de NLR (figura 6) foram transferidas, com o auxílio de uma pestana, para uma gota de água da torneira autoclavada e colocada no centro do disco de cenoura. Os discos de cenoura assim inoculados foram incubados a 25°C, no escuro, durante 56 e 84 dias. Para cada isolado e período de desenvolvimento, foram feitas 10 réplicas, num desenho completamente casualizado.

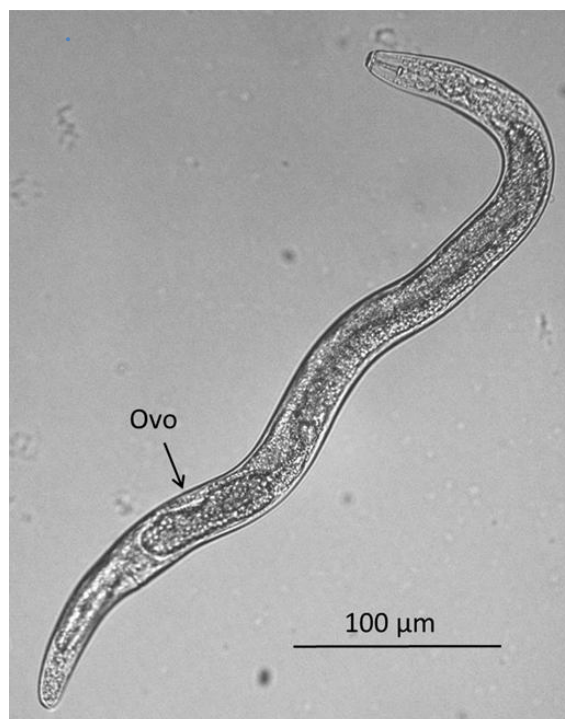


Figura 6- Fêmea grávida de *Pratylenchus* spp

Após incubação, os nemátodes foram extraídos por centrifugação, disco a disco. Para extração foi necessário proceder à homogeneização de cada disco de cenoura para o que era colocado num liquidificador com 200 mL de água durante 30 segundos, crivado (20 μ m) e a parte de cima do crivo resuspensa em 50 ml de solução de sacarose ($r = 1.15$). A mistura era depois levada ao misturador vibratório, distribuída por 6 tubos de vidro e centrifugada durante 3 minutos a 1500 g. O sobrenadante era crivado (20 μ m) e resuspenso em 20 ml de água. A densidade populacional final (Pf) (adultos, jovens e ovos) foi determinada à lupa com o auxílio de uma placa de Doncaster (figura 7). O fator de reprodução (FR) foi calculado com base na densidade populacional inicial e final (Pf/Pi). As diferenças entre os FR dos isolados e a proporção de adultos, jovens e ovos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), utilizando o software Statsoft Statistica versão 7 para Windows. Os dados foram normalizados, de modo a cumprir os requisitos necessários da análise de variância, usando a função logarítmica.

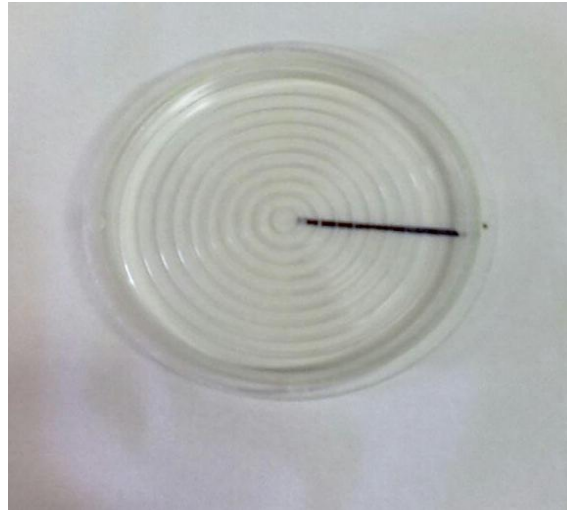


Figura 7- Placa de Doncaster usada para contagem de nemátodes

4.2 Resultados

4.2.1. Multiplicação *in vitro* dos isolados

Os isolados de *P. neglectus* (A5, A9, A38) e *P. penetrans* (A34) reproduziram-se nos discos de cenoura (figura 8). A partir dos discos inoculados e após um período de incubação de cerca de 3 meses, foram obtidos nemátodes suficientes para iniciar os estudos seguintes. Durante o período de incubação observaram-se alterações à superfície dos discos de cenoura, adquirindo um aspeto esbranquiçado, e, por vezes, verificou-se a formação de “callus”. Surgiram, também, algumas contaminações, porém as cenouras que não se encontravam em bom estado foram descartadas.

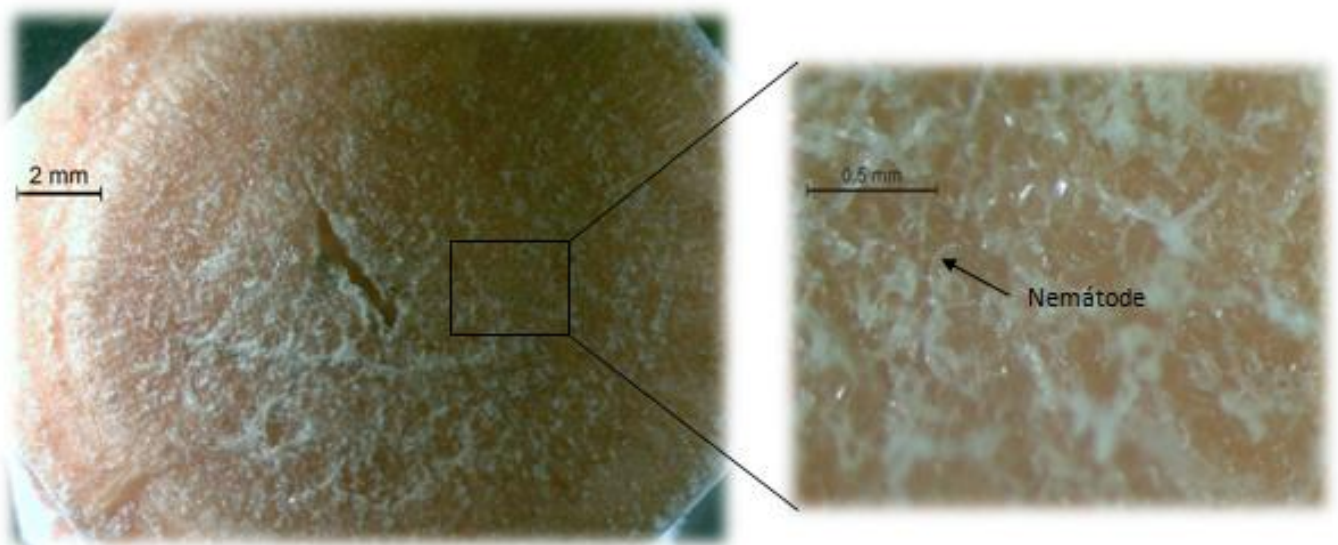


Figura 8- Cenoura infetada com *Pratylenchus* spp.

4.2.2. Estudo comparativo de multiplicação *in vitro*

Aos 56 dias após inoculação (DAI) verificou-se, em todos os isolados de *Pratylenchus* testados, um valor de FR > 1. Os valores de Pf dos isolados variaram, em média, entre 43 a 107 nemátodes, por disco de cenoura inoculado (tabela 4), tendo sido encontradas diferenças significativas

Tabela 4 - População final por disco de cenoura (Pf) e fator de reprodução (FR) de *Pratylenchus neglectus* (A5, A9, A38) e *P. penetrans* (A34) 56 dias após a inoculação (DAI) com 10 fêmeas grávidas (Pi)*.

<i>Pratylenchus</i> spp.	Isolado	DAI	Pf ⁽¹⁾	FR ⁽²⁾
	A5		107±17 ^{b,c,d}	11±2 ^{b,c,d}
<i>P. neglectus</i>	A9	56	47±42 ^{a,b,c}	5±4 ^{a,b,c}
	A38		158±21 ^{b,c,d}	16±2 ^{b,c,d}
<i>P. penetrans</i>	A34		43±10 ^{a,b}	4±1 ^{a,b}

* Valores médios de dez repetições ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma coluna não são significativamente diferentes (P < 0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD (Anexo I). ⁽¹⁾ Pf – densidade populacional final, ⁽²⁾ Fator de Reprodução, FR = Pf/Pi, Pi - densidade populacional inicial.

Considerando os diferentes estádios de desenvolvimento encontrados, verificou-se que a proporção de ovos foi inferior à de adultos e jovens (figuras 9 e 10). Aos 56 DAI, a proporção de adultos foi significativamente superior à de jovens e ovos, para os isolados A5 e A38 de *P. neglectus* (figura 9A). Nos restantes isolados, a proporção de jovens foi superior ou idêntica à de adultos (figuras 9A e 10).

Aos 84 DAI, também foram encontradas diferenças significativas no FR dos isolados de *P. neglectus* (tabela 5), com valores de Pf que variaram, em média, entre 121 e 1939 nemátodes por disco de cenoura.

Tabela 5- População final por disco de cenoura (Pf) e fator de reprodução (FR) de *Pratylenchus neglectus* (A5, A9, A38) e *P. penetrans* (A34) 84 dias após a inoculação (DAI) com 10 fêmeas grávidas (Pi)*.

<i>Pratylenchus</i> spp.	Isolado	DAI	Pf ⁽¹⁾	FR ⁽²⁾
	A5		881±323 ^{f,e}	88±32 ^{f,e}
<i>P. neglectus</i>	A9	84	1833±469 ^{f,g}	183±47 ^{f,g}
	A38		1939±835 ^{e,f,g}	194±84 ^{e,f,g}
<i>P. penetrans</i>	A34		121±33 ^{a,b,c,d}	12±3 ^{a,b,c,d}

* Valores médios de dez repetições ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma coluna não são significativamente diferentes ($P < 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD (Anexo I). ⁽¹⁾ Pf – densidade populacional final, ⁽²⁾ Fator de Reprodução, FR = Pf/Pi, Pi - densidade populacional inicial.

Verificou-se que o FR aumentou com o tempo de incubação e foi superior nos isolados A38 e A9. A proporção de adultos foi significativamente superior à proporção de jovens e ovos nos isolados A5 e A9 (figura 9 B). De entre todos os isolados testados, o isolado A34 de *P. penetrans* mostrou ter menor capacidade reprodutiva em cenoura (tabela 5). Neste isolado, a proporção de adultos aos 84 DAI foi significativamente superior, comparativamente à proporção aos 56 DAI (figura 10). Para o mesmo isolado, o número de nemátodes obtido por disco de cenoura foi bastante variável (tabelas 4 e 5).

Esta variabilidade entre réplicas, na população final obtida, foi observada em todos os isolados estudados.

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE NEMÁTODES-DAS-LESÕES-RADICULARES, *PRATYLENCHUS* SPP. ASSOCIADOS À CULTURA DA BATATEIRA EM PORTUGAL

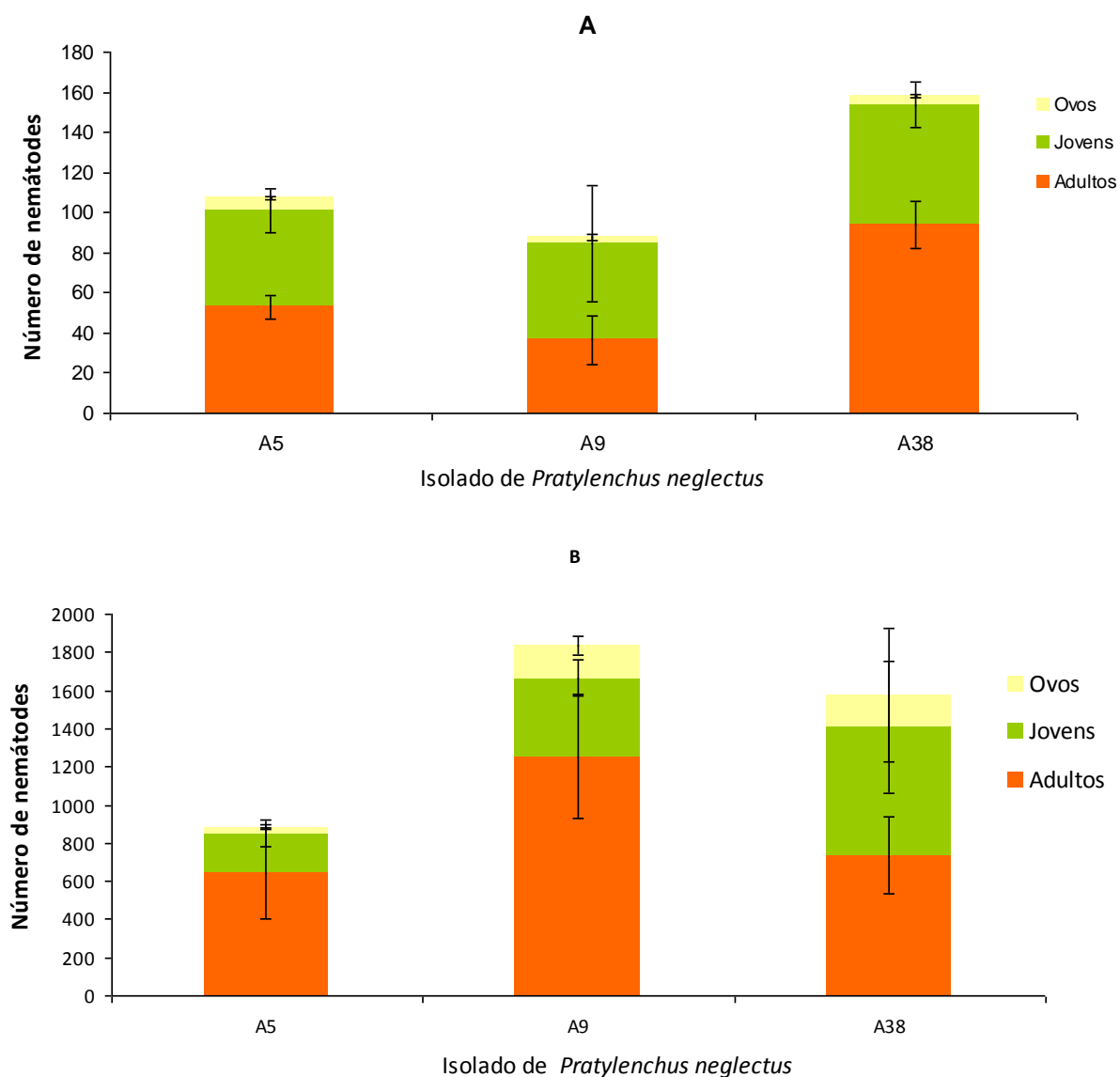


Figura 9- Proporção de adultos, jovens e ovos nos isolados *Pratylenchus neglectus*, A aos 56 DAI e B aos 84 DAI

Número de nemátodes

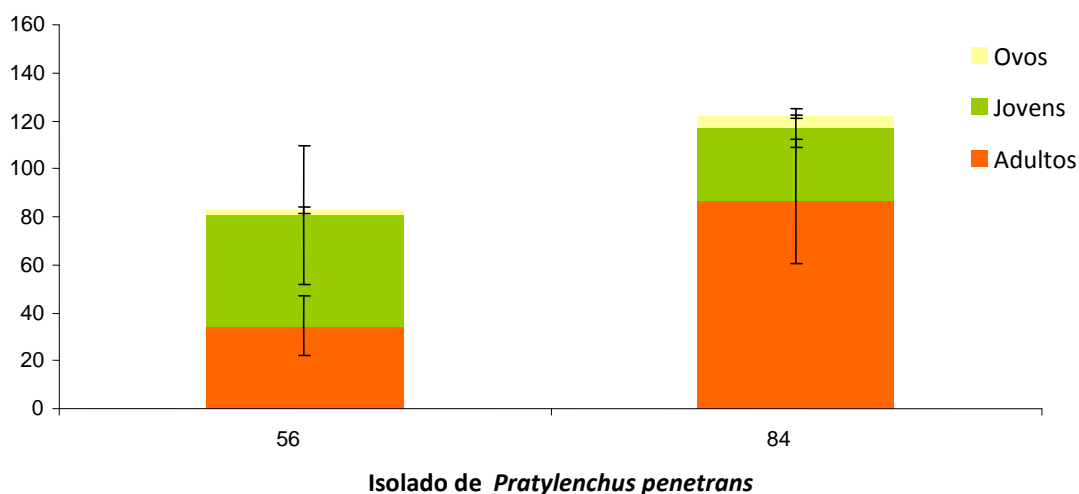


Figura 10- Proporção de adultos, jovens e ovos no isolado de *Pratylenchus penetrans*

4.3 Discussão

O tempo de incubação influenciou a densidade populacional final e a taxa de reprodução dos NLR. Aos 84 DAI, a Pf de todos os isolados de *P. neglectus* testados foi significativamente superior à Pf observada aos 56 DAI. Resultados semelhantes foram obtidos por Castillo *et al.* (1995), com *P. thornei*. Nesta espécie, a densidade populacional aumentou exponencialmente com o tempo de incubação (25, 50 e 100 DAI), sendo máxima aos 100 DAI, a 25°C. Após esse tempo, observou-se um decréscimo na taxa de multiplicação de *P. thornei* devido à escassez de alimento e competição dos nemátodes pelo espaço disponível. Nesse estudo a reprodução de *P. thornei* aos 100 DAI foi bastante superior (FR= 3610) à observada no presente estudo para *P. neglectus* (FR= 88 a 194; 84 DAI). No entanto, no estudo de Castillo *et al.* (1995), o número de fêmeas inoculadas em cada disco de cenoura foi superior (Pi = 25 fêmeas), comparativamente com um Pi= 10 fêmeas, usado neste estudo, para além do tempo de incubação também maior (100 DAI). A multiplicação de um isolado de *P. neglectus*, obtido a partir de raízes de pessegueiro, *Prunus persica*, em discos de cenoura, foi anteriormente avaliada por Verdejo-Lucas *et al.* (1992) e comparada com os FR de quatro outros nemátodes endoparasitas migratórios, *P. thornei*, *P. vulnus*, *Radopholus similis*, e *Zygotylenchus guevarai*. Embora todos os nemátodes estudados tenham conseguido completar o seu ciclo de vida e multiplicar-se, o número de nemátodes recolhidos por disco de cenoura,

após inoculação de 10 fêmeas (Pi), incubação a 26°C e 90 DAI, variou consoante a espécie envolvida. As densidades populacionais mais elevadas foram obtidas para os nemátodes *R. similis* e *P. vulnus* com FR= 2341 e FR= 1659 respetivamente. *P. thornei* e *Zygotylenchus guevarai* apresentaram FR semelhantes (FR= 202 e FR= 146) mas, mais baixos do que os FR de *R. similis* e *P. vulnus*. A população de *P. neglectus* aumentou 74 vezes (FR=74), sendo este aumento inferior ao observado nos restantes nemátodes. No entanto, a reprodução de *P. neglectus*, avaliada por Verdejo-Lucas *et al.* (1992), foi semelhante à observada no isolado A5 avaliado neste estudo. A duração do ciclo de vida dos nemátodes endoparasitas migratórios pode variar entre 20 a 50 dias, dependendo da espécie, temperatura e planta hospedeira. Uma vez que foi utilizado o mesmo hospedeiro (discos de cenoura), o valor inferior de FR observado em *P. neglectus*, relativamente a outras espécies de NLR, nomeadamente *P. thornei* e *P. vulnus*, pode ser justificado devido a diferenças nas temperaturas ótimas para cada espécie de NLR (Verdejo-Lucas *et al.*, 1992). Por outro lado, a cenoura poderá não ser o hospedeiro preferencial para multiplicação de alguns isolados de *P. neglectus*. Embora a técnica da multiplicação *in vitro* de nemátodes em cenoura seja recomendada para obtenção de inóculo de NLR (Castillo & Vovlas, 2007), densidades populacionais elevadas de *P. neglectus* foram obtidas, anteriormente, em raízes excisadas de milho, tabaco e trevo, após incubação a 30 °C (Verdejo-Lucas *et al.*, 1992). Neste estudo, aos 84 DAI, foram ainda encontradas diferenças significativas na reprodução entre isolados de *P. neglectus* e na proporção de adultos, jovens e ovos encontrada. Para dois isolados (A5 e A38) a proporção de adultos foi significativamente superior à de jovens e ovos, enquanto que para o isolado A9, a proporção de jovens foi superior ou idêntica à de adultos. Diferenças reprodutivas e na proporção dos diferentes estádios de desenvolvimento já foram encontradas anteriormente entre isolados de *P. vulnus* (Pinochet *et al.*, 1994). Essas diferenças de comportamento foram confirmadas através de técnicas moleculares (PCR-RFLP), que revelaram a existência de polimorfismos (variações nas sequências de nucleótidos de DNA) entre isolados de *P. vulnus* (Pinochet *et al.*, 1994). A existência de variabilidade enzimática entre isolados de *P. coffeae* foi também reportada por Andrés *et al.* (2000), através de estudos bioquímicos. As diferenças de reprodução encontradas entre isolados nesta parte do trabalho, sugerem assim, a existência de variabilidade intra-específica em *P. neglectus*. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar esta variabilidade. De qualquer modo, neste estudo os isolados de *P. neglectus* mostraram uma aptidão reprodutiva alta em cenoura, quando comparados com os resultados obtidos para *P. penetrans*. O isolado A34 de *P. penetrans* mostrou ter menor

capacidade reprodutiva, o que sugere que este isolado poderá ter menor capacidade reprodutiva em cenoura e, possivelmente, também na batata. De futuro, será desejável avaliar a sua patogenicidade noutras culturas. Estudos moleculares deverão investigar, ainda, a existência ou não de diferenças moleculares entre isolados com aptidões reprodutivas baixas e altas. Verdejo-Lucas *et al.*, (1992) verificou que as espécies com maior aptidão reprodutiva em cenoura foram aquelas cuja reprodução era, essencialmente, sexuada. Porém, neste trabalho observou-se o contrário, dado que valores de FR mais elevados foram encontrados em *P. neglectus*, uma espécie cuja reprodução é essencialmente assexuada.

5. Avaliação da patogenicidade de dois isolados de *Pratylenchus neglectus*

Os estragos causados por NLR nas plantas diferem consoante o isolado e espécie da planta hospedeira. Enquanto algumas plantas toleram densidades populacionais de NLR relativamente elevadas, sem causar estragos visíveis, noutras, densidades populacionais relativamente baixas produzem estragos significativos. O grau de patogenicidade também pode ser afetado pelo estado nutricional da planta hospedeira e/ou fatores edáficos. Estudos conduzidos em cerejeira, por Melakeberham (1997), demonstraram que a acumulação de nutrientes nos tecidos vegetais da planta, promove o seu crescimento e vigor e, simultaneamente, influencia, negativamente, as populações de NLR. Outros fatores como a temperatura, humidade, pH e textura do solo podem influenciar a proliferação dos NLR na planta hospedeira. Diferenças de patogenicidade entre isolados de NLR têm sido encontradas e podem ser quantificadas através da medição da sua capacidade de multiplicação *in vitro* e virulência (Pinochet *et al.*, 1994). Essas variações sugerem variabilidade intraespecífica no genoma de *Pratylenchus* (France & Brodie, 1995; Duncan *et al.*, 1999).

Nesta parte do trabalho, a patogenicidade de dois isolados de *P. neglectus* (A5 e A9) foi avaliada em duas variedades comerciais de batata distintas, variedades Agria e Monalisa.

A variedade Agria tem um ciclo vegetativo semi-tardio, a cor da pele do tubérculo é amarela, a polpa é relativamente fina, ligeiramente farinhenta e tem baixo a médio teor de matéria seca (DGAV, 2013). Esta variedade apresenta resistência elevada a *Globodera* (DRAPN, 2011). Por sua vez, a variedade Monalisa tem um ciclo vegetativo semi-precoce, a cor de pele do tubérculo varia de branca a amarela, tem uma polpa firme e baixo teor de matéria seca. Esta variedade tem baixa resistência aos NQB (DRAPN, 2011). A resistência destas duas variedades aos NLR, no entanto, não é conhecida.

5.1.1 Materiais e métodos

Os ensaios de patogenicidade dos isolados de *P. neglectus* (A5 e A9) foram realizados em vasos. Batateiras jovens foram inoculadas com NLR (2 000 nemátodes/planta, população inicial-Pi) em vasos com 1 kg de solo esterilizado (80-90% de areia, 5-10% de argila, 5-10% de matéria orgânica, pH = 6-7). Foram incluídas plantas de controlo, não inoculadas com nemátodes. Os tratamentos foram repetidos seis vezes num delineamento em vasos casualizado. Os vasos foram mantidos numa estufa com fotoperíodo de 12 horas e temperatura a 25°C e foram regados, diariamente, com água da torneira. Na colheita, passados 84 dias, as raízes foram observadas para detetar a presença / ausência de lesões necróticas, e foram registados os seguintes parâmetros: peso fresco e comprimento da raiz, peso dos tubérculos e índice de gravidade do tecido radicular necrosado (IGTN) (figura 11). O IGTN foi avaliado numa escala de 0 a 10: 0 = 0% tecido necrosado; 10 = 90 a 100% tecido necrosado (Castillo *et al.*, 1998). Após 84 DAI os nemátodes foram extraídos do solo, durante 8 dias, e das raízes, durante 14 dias. Para as raízes foi utilizado o método do funil (Baermann, 1917), tendo sido utilizado um funil de vidro, com um tubo de borracha ligado ao pé do funil, fechado com uma mola. Utilizou-se um suporte de metal e colocou-se um crivo de 75 µm dentro do funil, onde foram colocadas as raízes cortadas em segmentos de 1 cm. Os funis foram cheios com água da torneira e foram mantidos durante 48h à temperatura ambiente (figura 12). Após este tempo, extraiu-se a água abrindo a mola, e voltou-se a colocar nova água. A suspensão recolhida foi crivada num crivo de 20 µm e os nemátodes que ficaram na parte de cima do crivo foram suspensos em 20 ml de água e contados à lupa com o auxílio de uma placa de Doncaster. Este procedimento repetiu-se, 7 vezes, até perfazer 14 dias (Tihohod, 1993). Para o solo foi utilizado o método do tabuleiro (Whitehead & Hemming 1965). Amostras de 200 g de solo foram colocadas sobre papel fino tipo Kleenex que, por sua vez, se encontrava suportado por uma rede de plástico de malha grossa colocada sobre um tabuleiro de plástico. O solo foi espalhado uniformemente sobre o papel e adicionou-se água até o solo ficar húmido (figura 12). Após 48h, a suspensão com nemátodes foi vertida cuidadosamente para um copo de vidro, foi crivada num crivo de 20 µm e resuspensa em 20 ml de água da torneira. A suspensão foi observada à lupa e o número de NLR foi quantificado (figura 9). Este procedimento repetiu-se até perfazer 8 dias (Coyne *et al.*, 2007). As densidades finais (Pf) foram determinadas e os fatores de reprodução calculados ($FR = Pf/Pi$). Os resultados obtidos com as diversas cultivares foram submetidos a análise estatística (ANOVA).

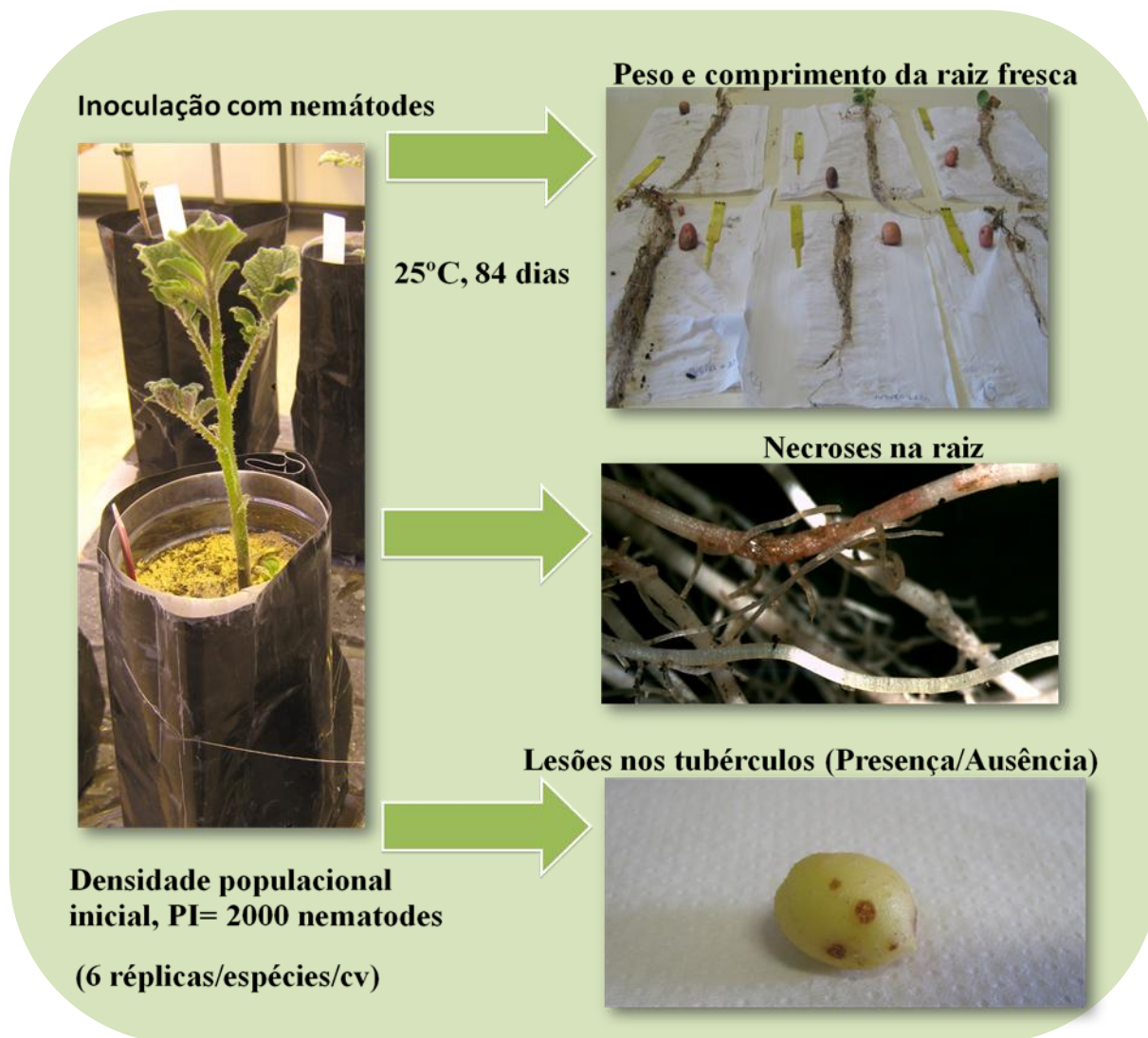


Figura 11- Ensaio em vasos com cultivares de batata

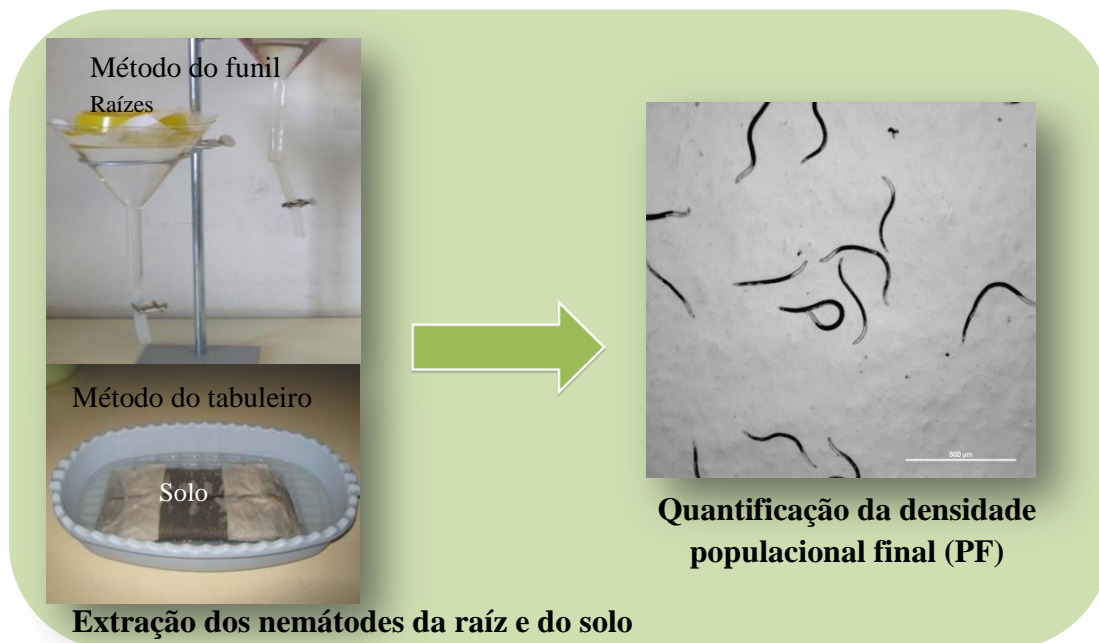


Figura 12- Métodos de extração de nemátodes em raízes (método do funil) e no solo (método do tabuleiro)

5.1.2 Resultados

Ambos os isolados de *P. neglectus* (A5 e A9) foram capazes de se reproduzir nas variedades Agria e Monalisa aos 84 DAI (FR > 1). Comparativamente a A5, o isolado A9 demonstrou ter maior capacidade reprodutiva em ambas as variedades testadas. No entanto, essas diferenças foram significativas apenas para a variedade Monalisa (tabela 5). Não foram observadas diferenças na reprodução do isolado A5 nas variedades Agria e Monalisa. O peso e o comprimento da raiz das plantas inoculadas com nemátodes não foram significativamente diferentes dos observados nas plantas que serviram de controlo (tabela 6).

Tabela 6- Reprodução de *Pratylenchus neglectus* (isolados A5 e A9) em *Solanum tuberosum* L. variedades. Agria e Monalisa, 84 dias após inoculação com 2000 nemátodes / planta a 25 °C*

Variedades	Tratamento	Peso Raiz (g)	Comprimento Raiz (cm)	Peso Tubérculo (g)	IGTN ⁽¹⁾	FR ⁽²⁾
Agria	Controlo	2,2±0,2 ^{a,b}	37,0±0,1 ^a	3,6±1,3 ^{a,b}	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^{a,b}
	A5	1,9±0,1 ^{a,b}	33,5±3,3 ^a	4,2±0,5 ^{a,b}	0,5±0,2 ^b	1,4±0,4 ^{a,b,c}
	A9	1,5±0,2 ^{a,b}	33,9±4,9 ^a	3,6±1,0 ^{a,b}	1,0±0,0 ^b	2,2±0,4 ^{b,c}
Monalisa	Controlo	4,8±0,8 ^{c,d}	38,3±3,3 ^a	10,9±2,0 ^{b,c}	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^{a,b}
	A5	2,3±0,2 ^{a,b}	33,6±4,1 ^a	6,3±0,5 ^{a,b,c}	0,7±0,2 ^b	1,1±0,5 ^{a,b,c}
	A9	5,0±0,7 ^{c,d}	36,6±1,6 ^a	8,0±3,0 ^{a,b,c}	2,5±0,4 ^c	5,9±1,2 ^d

* Valores médios de seis repetições ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma coluna não são significativamente diferentes (P < 0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD (Anexo I). ⁽¹⁾ Índice de Gravidade do tecido radicular necrosado, IGTN; 0-10, com base na escala 0 = 0%, 10 = 90 a 100% tecido necrosado. ⁽²⁾ Fator de Reprodução, FR = Pf (densidade populacional final (substrato + raízes) / Pi (densidade populacional inicial).

O peso médio dos tubérculos da variedade Monalisa foi significativamente superior nas plantas que serviram de controlo. Nas plantas inoculadas com nemátodes, foram detetados NLR quer no solo, quer nas raízes (tabela 7). A Pf de NLR encontrada nas raízes foi superior à Pf encontrada no solo nas variedades Agria e Monalisa parasitadas com o isolado A9. No isolado A5 o valor de Pf raiz não foi significativamente diferente do Pf solo (tabela 7). Foram ainda observadas lesões nas raízes e protuberâncias, em forma de verruga nos tubérculos, nas

plantas inoculadas com nemátodes, em particular em plantas infetadas com o isolado A9. Nos tubérculos que continham “verrugus”, foram detetados NLR nos estados juvenil e adulto, após a incubação de secções dos tubérculos em água. O IGTN variou de 0 a 2,5 sendo significativamente diferente apenas para o isolado A9 com a variedade Monalisa.

Tabela 7- População final de *Pratylenchus neglectus* (isolados A5 e A9) no solo e em raízes de *Solanum tuberosum* L., 84 dias após inoculação com 2000 nemátodes/planta, a 25 °C*

Variedade	PF	A5	A9
Agria	Raiz	1872,2±720,4 ^a	3179,2±817,7 ^{b,c}
	Solo	915,1±217,5 ^a	1114,7±247,6 ^{a,b}
Monalisa	Raiz	783,3±500,5 ^a	8823,0±2519,3 ^d
	Solo	1455,0±488,1 ^a	2826,0±803,4 ^{a,b,c}

* Valores médios de seis repetições ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra dentro de uma coluna não são significativamente diferentes (P <0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD (Anexo I); Pf – densidade populacional final.

5.1.3 Discussão

Ambos os isolados de *P. neglectus* foram capazes de se multiplicar e completar o seu ciclo de vida nas duas variedades de batata testadas após 84 DAI. Os valores de FR variaram entre 1,1 a 5,9, sendo o isolado A9 o que apresentou maior capacidade reprodutiva. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Griffin (1992), de 3,2 a 3,9 mas, mais baixos que os encontrados no estudo de Olthof (1990), onde o valor de FR foi de 8,4. Segundo Verdejo-Lucas (1992), existem vários fatores que podem influenciar a reprodução e a taxa de desenvolvimento dos NLR. Este estudo foi conduzido a uma temperatura de 25°C, mas, os trabalhos realizados por Verdejo-Lucas (1992) e por Griffin (1992), em que se verificaram valores mais elevados de reprodução de *P. neglectus*, foram realizados a temperaturas próximas de 30°C. A utilização de temperaturas abaixo do nível ótimo de reprodução pode, deste modo, ter influenciado os resultados obtidos no ensaio. Algumas variações detetadas na temperatura da estufa durante o período em que decorreu o ensaio, poderão também justificar os valores baixos de FR que foram obtidos. No entanto, apesar destes valores serem mais

baixos do que os obtidos com outros nemátodes fitoparasitas em batata (Maleita *et al.*, 2012), o simples facto dos NLR se conseguirem reproduzir em ambas as variedades, é o suficiente para potenciar o aumento progressivo das densidades populacionais destes nemátodes no solo, ameaçando a cultura seguinte, mesmo num sistema de rotação, se forem culturas hospedeiras de NLR. Os resultados obtidos talvez possam permitir concluir que os ensaios em cenoura forneceram uma boa indicação sobre o comportamento dos NLR na batata, uma vez que o isolado A9 que apresentou valores de FR mais elevados no teste de multiplicação *in vitro*, foi o que apresentou também maiores valores no ensaio de vasos. Neste ensaio, o IGTN foi superior na variedade Monalisa com o isolado A9. Dada a maior reprodução deste isolado verificou-se que os estragos na zona radicular da planta se tornaram mais evidentes. O número de lesões necróticas seria provavelmente ainda maior se o ensaio tivesse sido prolongado para além dos 84 DAI. O facto do ensaio ter sido realizado em vaso também poderá ter limitado o comprimento e o peso da raíz e dos tubérculos produzidos, uma vez que o espaço disponível para o crescimento, tanto da raíz como dos tubérculos, era restrito. Em ensaios de campo estes valores seriam provavelmente diferentes e mais elevados, pois as raízes não teriam qualquer limitação de espaço para crescer e os tubérculos poderiam crescer normalmente, ainda que nessas condições os fatores externos como temperatura, humidade, pH e textura do solo, fossem mais difíceis de controlar.

6. Conclusões finais/Considerações finais

No final deste trabalho pode considerar-se que os objetivos inicialmente propostos foram cumpridos. Confirmou-se molecularmente a identidade de três isolados de *P. neglectus* e um de *P. penetrans*, ambas as espécies de NLR são importantes devido à sua ampla distribuição geográfica e patogenicidade em várias culturas hospedeiras, nomeadamente na batata. Em relação à capacidade de multiplicação *in vitro* destas espécies, podemos concluir que os isolados de *P. neglectus* mostraram uma aptidão reprodutiva alta e que o isolado A34 de *P. penetrans* mostrou ter menor capacidade reprodutiva em cenoura, o que pode sugerir que esta espécie poderá ter menor capacidade reprodutiva no geral e, portanto, também em batata. No entanto, são necessários estudos futuros com vista à avaliação e determinação do potencial reprodutivo de um maior número de isolados de *P. penetrans*, para confirmar esta sugestão.

Mais estudos em vaso ou em campo serão igualmente importantes para melhor determinar a capacidade reprodutiva de *P. penetrans* em batata.

Estudos bioquímicos ou moleculares poderão esclarecer a existência de variabilidade intra-específica em *P. neglectus*, uma vez que neste trabalho foram encontradas diferenças significativas entre os valores do FR nos isolados estudados. A existência desta variabilidade, na patogenicidade entre isolados de uma mesma espécie de NLR, poderá dificultar o processo de seleção e melhoramento genético de batata de semente. Dado que a reprodução obtida *in vitro* para *P. neglectus* foi inferior à descrita para outras espécies de NLR, é possível que a cenoura não seja um hospedeiro preferencial para esta espécie e, de futuro, deverão ser estudados métodos alternativos para a obtenção de inóculo deste nemátode.

A avaliação da capacidade de reprodução dos NLR em duas variedades comerciais de batata revelou que, embora com diferenças, ambos os isolados de *P. neglectus* foram capazes de se multiplicar e completar o seu ciclo de vida nesta cultura. Tal como no ensaio de multiplicação em cenoura, os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugeriram a existência de variabilidade intra-específica em *P. neglectus*, uma vez que os FR obtidos foram diferentes entre os isolados estudados. Esta existência será um problema acrescido, uma vez que, para além da identificação das espécies presentes num solo, haverá necessidade de testar as diferentes variedades comerciais, com diferentes resultados da mesma espécie, de modo a avaliar que tipo de interação se estabelece em cada situação concreta.

7. Bibliografia

Abrantes, I. M. de O., Faria, C. A. T., & Santos, M. S. N. de A. (1987). Root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) in Portugal. *Nematologia Mediterranea* 15, 375-378.

Agrios, G. (2005). *Plant pathology* (5ª Edição). Academic Press.

Al-Banna, L., Ploeg, A., Williamson, V., & Kaloshian, I. (2004). Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology* 32, 142-146.

Andres, M. F., Pinochet, J., Hernandez-Dorrego, A. & Delibes A. (2000). Detection and analysis of inter- and intraspecific diversity of *Pratylenchus* spp. using isozyme markers. *Plant Pathology* 49, 640-649.

Baermann, G. (1917). A simple method to recover larvae of *Ancylostomus* (Nematoda) from soil samples. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch - Indie* 57, 131-137.

Belchior, A.N. (2000). Tendências na produção da batata. *Frutas, Legumes e Flores* 55, 55-58.

Bernard, E.C. (1992). Soil nematode diversity. *Biology and Fertility of Soils* 14, 99-103.

Castillo, P., Trapero-Casas, J. L. & Jiménez-Díaz, R. M. (1995). Effect of time, temperature, and inoculum density on reproduction of *Pratylenchus thornei* in carrot disk cultures. *Journal of Nematology* 27, 120-124.

Castillo, P., & Vovlas, N. (1998). Pathogenicity and histopathology of *Pratylenchus thornei* populations on selected chickpea genotypes. *Plant Pathology* 47, 370-376.

Castillo, P., & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): Diagnosis, biology, pathogenicity and management (Nematology monographs and perspectives). Leiden, The Netherlands: Koninklijke Brill.

Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional, COTHN (2008). Balanço da campanha de batata. Relatório técnico, 9 pp. http://www.cothn.pt/files/7762_Relatori_4939003baf4de.pdf

Conceição, I. L. P. M. da, Cunha, M. J. M. da, Feio, G., Correia, M., Vieira dos Santos, M. C., Abrantes, I. M. de O. (2009). Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on potato in Portugal. *Nematology* 11, 311-313.

Coyne, D.L., Nicol, J. M. & Claudius-Cole, B. (2007). Nematologia prática: um guia de laboratório. Tradução de Isabel Abrantes. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.

Cunha, M. J. M. da, Conceição, I. L. P. M. da, Abrantes, I. M. de O., Evans, K., & Santos, M. S. N. de A. (2004). Characterization of potato cyst nematode isolates from Portugal. *Nematology* 6, 55-58.

De la Peña, E., Karssen, G., & Moens, M. (2007). Distribution and diversity of root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) associated with *Ammophila arenaria* in coastal dunes of Western Europe. *Nematology* 9, 881-901.

De Leij, O., Félix, M. A., Frisse, L., Nadler, S., Sternberg, P., & Thomas, W. (1999). Molecular and morphological characterization of two reproductively isolated species with mirrorimage anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology* 1, 591-612.

Direção Geral de Alimentação e Veterinária, DGAV (2013). Catálogo Nacional de variedades, 20 pp.

Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte, DRAPN, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2011). Avisos agrícolas nº2, Estação de avisos de Entre Douro e Minho. 6 pp.

Duncan, L.W., Inserra, R. N., Thomas, W. K., Dunn, D., Mustika, I., Frisse, L. M., Mendes, M. L., Morris, K., & Kaplan, D. T. (1999). Genetic and morphological relationships among isolates of *Pratylenchus coffeae* and closely related species. *Nematropica*, 29, 61-80.

Ducreux, G., Rossignol, L. & Rossignol, M. (1986). La pomme de terre. *La Recherche* 17, 192-203.

Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimisation and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 559-70.

Eisenback, J.D. & Triantaphyllou, H.H. (1991). Root-Knot Nematodes: *Meloidogyne* species and races.. Manual of Agricultural Nematology (eds. Nickle, W.R.) Marcel Dekker Inc., New York, EUA. pp. 191-274

Esteves, I-, Maleita, C. & Abrantes, I. (2015). Root-lesion and root-lesion nematodes parasitizing potato. *European Journal of Plant Pathology* 141, 397-406

Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division, F.A.O.S.T.A.T. (2013). Yield (ton/ha), potato. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>

France, R. A & Brodie, B. B. (1995). Differentiation of two New York isolates of *Pratylenchus penetrans* based on their reaction on potato. *Journal of Nematology* 27, 339-345.

Gonzaga, V. & Santos, J. M. (2010). Estudo comparativo de multiplicação *in vitro* de seis espécies de *Pratylenchus* em cilindros de cenoura. *Nematologia brasileira* 34, 226-230.

Griffin, G. D. (1992). Pathological effects of *Pratylenchus neglectus* on wheatgrasses. *Journal of Nematology* 24, 442-449.

Henriques, L. (2012). Nemátodes de Quisto da batateira - *Globodera rostochiensis* e *G. pallida*. Boletim técnico. Instituto Nacional de Recursos Biológicos. Obtido em Setembro de 2014, 9 pp., http://www.iniav.pt/fotos/editor2/globodera_rostochiensis_e_g._pallida__nematodos_de_quisto_da_batateira.pdf.

Hague, N. G. M. & Gowen, S. R. (1987). Chemical control of nematodes. Principles and practice of nematode control in crops (Eds. Brown R. H e Kerry, B. R) Academic Press, pp.131- 178.

Holgado, R., Oppen Skau, K. A., & Magnusson, C. (2009). Field damage in potato by lesion nematode *Pratylenchus penetrans*, its association with tuber symptoms and its survival in storage. *Nematologia Mediterranea* 37, 25-39.

Instituto Nacional de Estatística, I.N.E. (2013). Estatísticas Agrícolas. Lisboa, Portugal.

Jatala, P., & Bridge, J. (1990). Nematodes parasites of root and tuber crops. , Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture (Eds. M. Luc, R. A. Sikora, & J. Bridge Wallingford, UK: CAB International. pp. 137-180.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Guar, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., et al. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14, 946-961.

Kerry, B. R. (1990). An assessment of progress toward microbial control of plant- parasitic nematodes. *Supplement to the Journal of Nematology* 22, 621-631.

Lopes, A., & Simões, A. M. (2006). Produção Integrada em Hortícolas. Família das solenáceas- Batata, Beringela, Pimento, Tomate. Oeiras: Direcção- Geral de Protecção das Culturas- DGPC. 326 pp.

Loof, P.A.A. (1991). The Family Pratylenchidae Thorne, 1949. Manual of Agricultural Nematology. (eds.Nickle, W. R.), Marcel Dekker, New York: EUA .pp. 363–421.

Mai, W.F. & Abawi, G.S. (1987). Interactions among root-knot nematodes and fusarium wilt fungi on host plants. *Annual Review of Phytopathology* 25, 317-338.

Maleita, C.M., Curtis, R.H.C., Powers, S.J. and Abrantes, I.M. de O. (2012). Host status of cultivated plants to *Meloidogyne hispanica*. *European Journal of Plant Pathology* 133, 449-460.

Melakeberhan, H., Bird, G.W. & Gore, R. (1997). Impact of plant nutrition on *Pratylenchus penetrans* infection of *Prunus avium* rootstocks. *Journal of Nematology* 29, 381-388

Nickle, W.R. (1991). Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, New York, EUA.

O'Bannon, J.H. & Taylor, A.L. (1968). Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. *Phytopathology* 58, 385.

Observatório dos Mercados Agrícolas e Importações Agro-Alimentares, O.M.A.I.A.A, (s.d) . Obtido em 26 de Setembro de 2014, de http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=108

Olthof, H. A. (1990). Reproduction and Parasitism of *Pratylenchus neglectus* on Potato. *Journal of Nematology* 22, 303-308

Pinheiro, J. B., Lopes, C. A., & Henz, G. P. (2009). Medidas Gerais de Controle de Nematóides de Batata. Brasil: EMBRAPA .

Pinochet, J., Cenis, J.L., Fernandez, C., Doucet, M. & Marull, J. (1994). Reproductive fitness and random amplified polymorphic DNA variation among isolates of *Pratylenchus vulnus*. *Journal of Nematology* 26, 271-277.

Rowe, R. C., Riedel, R. M., & Martin, M. J. (1985). Synergistic interactions between *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans* in Potato Early Dying Disease. *Phytopathology* 75, 412-418.

Santos, M. S. N. de A., Evans, K., Abreu, C. A., Martins, F. F., & Abrantes, I. M. de O. (1995). A review of potato cyst nematodes in Portugal. *Nematologia Mediterranea* 23, 35-42.

Sayre, R. M. & Walter, D. E. (1991). Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 29, 149-166.

Subbotin, S. A., Ragsdale, E. J., Mullens, T., Roberts, P. A., Mundo-Ocampo, M., & Balwain, J. G. (2008). A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular phylogenetics and evolution* 48, 491-505.

Tihohod, Dimitry. Nematologia Agrícola Aplicada. Jaboticabal, FUNEP, 1993.

Timmermans; B.G. H. Vos, J., Van Nieuwburg, J., Stomph, T. J., Van der Putten, P. E. L & Molendijk, P. G. (2007). Field performance of *Solanum sisymbriifolium*, a trap crop for potato cyst nematodes. I. Dry matter accumulation in relation to sowing time, location. *Annals of Applied Biology* 150, 89-97.

Uehara, T., Mizukubo, T., Kushida, A., & Momota, Y. (1998). Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44, 357-368.

Verdejo-Lucas S. & Pinochet, J. (1992). Population densities of five migratory endoparasitic nematodes in carrot disk cultures. *Journal of Nematology* 24, 96-98.

Waeyenberge, L., Ryss, A. M., M., Pinochet, J., & Vrain, T. C. (2000). Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus species* using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. *Nematology* 2, 135-142.

Whitehead, A. G., & Hemming, J. R. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematode from soil. *Annals of Applied Biology* 55, 25-38.

Yan, G., Smiley, R., Okubara, P., Skantar, A., Easley, S., & Sheedy, J. A & Thompson, A.. (2008). Detection and discrimination of *Pratylenchus neglectus* and *P. thornei* in DNA extracts from soil. *Plant disease* 92 , 1480-1487.